Trousse pour la détermination radioimmunologique de la L-thyroxine (T4)

Contenu de la trousse :

- 1 flacon de solution de traceur **^{125}I-T4**, < 150 kBq, liquide, 105 ml de tampon, azoture de sodium et un colorant jaune.
- 2 x 50 **tubes revêtus d'anticorps** de mouton anti-T4.
- 6 flacons de **standards** de T4 liquides, contenant chacun 0,5 ml de sérum humain et de l'azoture de sodium, concentration allant de 0 à 360 ng/ml T4.
- 1 flacon de **sérum de contrôle** de T4 liquide, contenant 0,5 ml de sérum humain et de l'azoture de sodium, concentration indiquée sur l'étiquette.
- 1 sachet plastique
- 1 mode d'emploi.

Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. Eviter toute absorption des réactifs ainsi que tout contact avec la peau ou les muqueuses. L'azoture de sodium peut réagir avec les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azotures de métaux fortement explosifs. Les diluer abondamment lors de l'évacuation des déchets.

1. Introduction

La thyroxine (T4), acide aminé renfermant de l'iode et élaboré uniquement dans la thyroïde, est une hormone dont la concentration sérique est contrôlée par un mécanisme de rétro-contrôle négatif par l'intermédiaire de la thyrotrophine (TSH). La glande thyroïde produit chez les sujets sains environ 80 µg de thyroxine par jour, dont plus de 99,9 % sont liés aux protéines plasmatiques dans le sang. La protéine véhicule proprement dite est la globuline liant la thyroxine (TBG), la préalbumine (TPBA) et l'albumine (TBA) jouant un rôle moins important dans les conditions normales. Le temps de demi-vie de la T4 s'élève à environ 8 jours.
La T4 est considérée comme étant le précurseur ou la forme de stockage de la triiodothyronine (T3), laquelle est environ 4 fois plus active par mole, mais 10 fois plus rapidement métabolisée. La T3 est élaborée en majeure partie à la périphérie à partir de la T4 par l'action de monodésiodases, mais elle est sécrétée également en faible quantité par la thyroïde.
La principale action pharmacologique de la T4 libre non liée à la globuline de transport (TBG), et de la T3 est la stimulation du métabolisme. Tous les organes peuvent être perturbés lorsque les valeurs s'écartent de la norme. Le développement intellectuel et physique de l'enfant est ralenti lorsque les valeurs sont trop basses.
Ce processus est dû à des troubles de la différenciation cellulaire et de la croissance.

2. Résultats cliniques et caractéristiques spécifiques obtenus avec le RIA-gnost® T4

2.1. Importance clinique du dosage de la T4

L'importance du dosage de la T4 réside dans le diagnostic différentiel permettant de distinguer la dystonie végétative de l'hyperthyroïdie. Il est donc indiqué en cas de soupçon aussi bien d'hypothyroïdie que d'hyperthyroïdie (maladie de Basedow et adénome de la thyroïde), de goitre et à titre de contrôle dans le traitement comportant une substitution par la thyroxine.
Certains facteurs cliniques ou métaboliques influent sur les taux de T4 ; ils seront étudiés ci-après. Une hypo ou une hyperthyroïdie peuvent donc parfois se recouper avec la plage euthyroïdienne, si bien que certains patients sont euthyroïdiens malgré des taux de T4 augmentés ou diminués. Ces patients présentent en général des taux de TBG modifiés.
Des taux accrus de T4 en cas de métabolisme euthyroïdien sont dus en partie à une élévation de la TBG pendant la grossesse et chez les femmes sous traitement par des oestrogènes/gestagènes (contraceptifs par exemple). On a enregistré des taux diminués de T4 en présence d'un métabolisme euthyroïdien par suite d'une TBG réduite en cas de néphrose ou sous un traitement par des androgènes. Les hépatopathies ainsi que les anomalies de TBG héréditaires exercent une influence variable sur le taux de T4, étant donné qu'elles peuvent entraîner une production de TBG aussi bien accrue que diminuée.
Le taux de T4 peut, malgré un métabolisme euthyroïdien, être diminué par des médicaments qui libèrent la T4 de la TBG (tels les salicylates) ou qui accélèrent le métabolisme de la T4 (tels les barbituriques et l'hydantoïne). En outre, il peut se former après une thyroïdite ou un cancer de la thyroïde des anticorps liant la T4 qui influent sur le dosage de cette dernière.
Il faut donc apprécier le dosage de la T4 en relation avec les données cliniques et d'autres paramètres d'analyses de laboratoire. Ainsi est-il judicieux de déterminer la capacité des protéines de fixation ou la concentration de TBG (par exemple avec le RIA-gnost TBG) pour éclaircir des résultats imprécis. On différencie une hypothyroïdie primitive d'une hypothyroïdie secondaire ou tertiaire par le dosage de la TSH sérique (par exemple avec RIA-gnost® TSH) avant ainsi que 20 à 30 minutes après stimulation par la TRH. L'hyperthyroïdie isolée due à la T3 ne peut être établie qu'au moyen du dosage de la T3 (par exemple avec le RIA-gnost® T3).

2.2. Valeurs attendues

La plage normale de la concentration sérique de la T4 a été établie chez l'homme et la femme au cours de l'essai clinique du RIA-gnost T4 :

Hyperthyroïdiens	> 110 ng/ml (> 142 nmol/l)
Euthyroïdiens	45 – 110 ng/ml (58 à 142 nmol/l)
Hypothyroïdiens	< 45 ng/ml (< 58 nmol/l)

Il est recommandé à chaque utilisateur de la trousse d'établir ses propres normes en raison d'éventuelles variations régionales ou des conditions opératoires du laboratoire.

2.3 Imprécision

Elle a été évaluée à l'aide de 3 échantillons dosés 24 fois dans la même série et dans 36 séries différentes.

Intra-essai

Echantillons	Moyenne (ng/ml)	CV (%)
1	56,9	5,6
2	115,4	4,5
3	299	4,0

Inter-essai

Echantillons	Moyenne (ng/ml)	CV (%)
4	26,9	14,3
5	84,1	5,1
6	181,4	4,6

2.4 Limite de détection
La limite de détection est définie comme étant la plus petite concentration détectable différente de 0 avec une probabilité de 95 %.
Elle a été évaluée à 2,5 ng/ml (3,2 nmol/l).

3. Principe du dosage et caractéristique du RIA-gnost® T4
Le RIA-gnost® T4 permet de doser in vitro la thyroxine totale (T4) dans le sérum humain selon le principe de l'analyse compétitive par saturation.
Sous l'action de l'acide 8-anilino-1-sulfonique, la T4 qui doit être mesurée est libérée des protéines de liaison et elle entre en compétition avec la ^{125}I-T4 pour atteindre les sites de fixation, d'un nombre limité, d'un anticorps anti-T4 spécifique. La quantité de T4 radioactive liée est donc inversement proportionnelle à la concentration de T4 de l'échantillon ou de l'étalon.
Un composant essentiel de la trousse RIA-gnost® T4 est représenté par les tubes revêtus d'anticorps. L'échantillon, c'est-à-dire le standard, le sérum de contrôle ou le sérum de patient, sera introduit avec le traceur dans le tube, puis incubé.
L'anticorps étant immobilisé sur la paroi interne de la partie inférieure du tube, la fraction libre du traceur peut être facilement séparée par décantation de la fraction liée à l'anticorps.
En mesurant la radioactivité de la ^{125}I-T4 liée à l'anticorps, on peut par conséquent lire la concentration sérique de T4 à partir d'une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions.
Les standards fournis, préparés à partir de sérum humain exempt de T4 et d'adjonctions de T4, ainsi que le sérum de contrôle et la T4 marquée à l'iode-125 sont livrés sous forme liquide.

4. Mode d'emploi
4.1. Matériel nécessaire
Micropipettes avec embout plastique interchangeable de 20 µl et de 1 ml ou distributeur de 1 ml ou diluteur/distributeur approprié, agitateur (150-400 tr/min), compteur gamma réglé pour la mesure de l'iode 125.

4.2. Préparation des réactifs
Conservés entre 2 et 8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
Porter à température ambiante (18 à 25°C) les compos ants de la trousse. Les réactifs portant le même numéro de lot peuvent être rassemblés.
Il convient de conserver les réactifs non utilisés entre 2 et 8°C. Les tubes revêtus d'anticorps sorti s de leur emballage et non utilisés doivent être stockés dans le sachet plastique fourni dans la trousse.

4.3. Préparation des échantillons
Après le prélèvement sanguin, préparer le sérum ou le plasma de la façon habituelle. Les tubes à essai siliconés pouvant perturber l'essai, il est déconseillé d'employer de tels tubes.
Utiliser le sérum ou le plasma rapidement pour le test ou le conserver pendant 3 jours au maximum entre 2 et 8°C. Il convient de le congeler à –20°C si on désire le conserver plus lon gtemps. Agiter soigneusement les échantillons après décongélation.

4.4. Mises en garde et précautions d'emploi
Les matières premières d'origine humaine contenues dans les réactifs de cette trousse ont été testées avec des trousses agréées et trouvées négatives en ce qui concerne les anticorps anti-HIV 1, anti HIV 2, anti-HCV et l'antigène HBs. Cependant aucune méthode d'analyse ne permet à ce jour de garantir totalement qu'une matière première d'origine humaine soit incapable de transmettre l'hépatite, le virus HIV, ou toute autre infection virale. Aussi faut-il considérer toute matière première d'origine humaine, y compris les échantillons à doser, comme potentiellement infectieuse.

4.5. Protocole de dosage
1. Marquer les tubes revêtus d'anticorps comme indiqué dans le tableau 1 (standards et échantillons en double).
2. Distribuer 20 µl de standard ou de sérum de patient au fond de chaque tube.
3. Ajouter 1 ml de traceur.

Les opérations 2 et 3 peuvent être effectuées en une seule phase au moyen d'un système distributeur/diluteur par aspiration de 20 µl d'échantillon ou de standard et distribution de 1 ml de traceur.

4. Agiter les tubes sur un agitateur horizontal pendant 2 heures (+/- 5 minutes) à température ambiante.
5. Retirer ensuite la solution par décantation, puis poser les tubes, retournés, sur du papier absorbant et les laisser ainsi pendant 2 à 5 minutes. Eliminer les restes de liquide pouvant adhérer au bord du tube en tapant brièvement les tubes. On peut également opérer par aspiration.

4.6. Mesure de la radioactivité
Mesurer la radioactivité se trouvant sur les tubes pendant 0,5 à 1 minute à l'aide d'un compteur gamma.

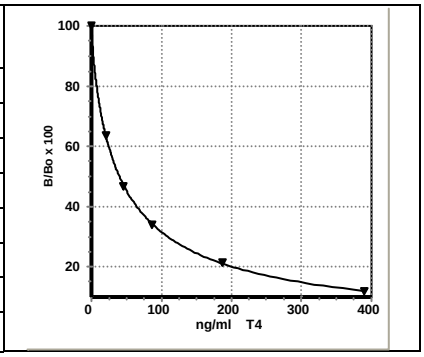
4.7. Lecture des résultats
Après avoir mesuré la radioactivité exprimée en coups par minute (cpm) de tous les standards S_0 à S_5, porter les résultats obtenus sur une feuille de papier millimétré préparée à cet effet en fonction de la concentration de T4 correspondante (cf. exemple d'une courbe d'étalonnage).
Construire la courbe étalon en reliant les points.
Etablir la moyenne des valeurs (cpm) obtenues pour le sérum d'un patient, puis lire la concentration de T4 à partir de la courbe d'étalonnage. Si l'on préfère exploiter les résultats à l'aide de la liaison en % (B/T), établir l'activité totale T et diviser les nombres de cpm mesurés par la valeur T.

Tableau 1 : protocole de dosage de la T4 (chaque fois en double)

	Standards (µl)					Sérum de contrôle (µl)		Echantillons (µl)		
N°des tubes	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	C	1	2	Etc.
Standards S_0	20/20									
S_1		20/20								
S_2			20/20							
S_3				20/20						
S_4					20/20					
S_5						20/20				
Sérum de contrôle C							20/20			
Echantillon 1								20/20		
Echantillon 2, etc.									20/20	Etc.
Traceur	◄---------- 1 ml ----------►									
	Agiter 2 heures (+/- 5 minutes) à température ambiante									
	Décanter ou aspirer le surnageant									
	Compter									

Exemple d'une courbe d'étalonnage

Groupe de tubes	cpm moyens	B/T x 100	B/Bo x 100	Concentration ng/ml
T	65669			
Standard 0	47741	72,7	100	0
Standard 1	30315		63,5	21,4
Standard 2	22338		46,7	46,0
Standard 3	16184		33,9	87,0
Standard 4	10168		21,3	187,0
Standard 5	5872		12,0	390,0
Contrôle	17807		37,3	75,0



5. Règles de base de radioprotection

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires couverts par cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée ni à l'homme ni aux animaux.
L'achat, la détention, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur.
L'application des règles de base de radioprotection assure une sécurité adéquate.
Un aperçu en est donné ci-dessous :
Les produits radioactifs seront stockés dans leur conteneur d'origine dans un local approprié.
Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.
La manipulation de produits radioactifs se fera dans un local approprié dont l'accès doit être réglementé (zone contrôlée).
Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques en zone contrôlée.
Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
Eviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.
Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.
Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.
Toute élimination de déchets radioactifs se fera conformément aux réglementations en vigueur.